

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**Requested document:****FR2612400 [click here to view the pdf document](#)****Microcapsules containing a radioactive and/or paramagnetic label in chelate form, and their use in the field of medical imaging**

Patent Number: FR2612400

Publication

date: 1988-09-23

Inventor(s): FOLLIOT VERONIQUE; JEUNE JEAN-JACQUES LE; JALLET PIERRE; BROSSE JEAN-CLAUDE BERNARD; COURAGE NATHALIE; PERDRISOT REMY ALAIN; SOUTIF JEAN-CLAUDE; VILLETTE JEAN-PAUL BERNARD

Applicant(s): UNIV ANGERS (FR); CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)

Requested

Patent: ☐ [FR2612400](#)

Application

Number: FR19870003616 19870316

Priority Number

(s): FR19870003616 19870316

IPC

Classification: A61K49/02; A61K9/50

EC

Classification: [A61K51/12M4](#)

Equivalents:

---

**Abstract**

---

Microcapsules which can be used in medical imaging, consisting of a wall made of biodegradable polymeric material enclosing an aqueous solution of an active substance, wherein the aforementioned active substance is a complexing or chelating agent or a paramagnetic and/or radioactive agent present in the form of a complex or chelate, and wherein the aforementioned particles can range from 0.5 to 5 micrometres approximately in size; and their use.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 612 400**

②1 N° d'enregistrement national :

**87 03616**

⑤1 Int Cl<sup>a</sup> : A 61 K 49/02, 9/50.

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 16 mars 1987.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 38 du 23 septembre 1988.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RE-  
CHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) et UNIVERSITE D'AN-  
GERS. — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Jean-Claude Bernard Brosse ; Pierre Jal-  
let ; Jean-Jacques Le Jeune ; Nathalie Courage ; Véro-  
nique Folliot ; Rémy Alain Perdrisot ; Jean-Claude Soutif ;  
Jean-Paul Bernard Villette.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Nony et Cie, Conseils en Bre-  
vets d'Invention.

⑤4 Microcapsules contenant un marqueur radioactif et/ou paramagnétique sous forme de chélate, et leur utilisation dans le domaine de l'imagerie médicale.

⑤7 Microcapsules utilisables en imagerie médicale, consti-  
tuées par une paroi en matériau polymérique biodégradable  
enveloppent une solution aqueuse d'une substance active, ca-  
ractérisées par le fait que ladite substance active est un agent  
complexant ou chélatant ou un agent paramagnétique et/ou  
radioactif présent sous la forme d'un complexe ou chélate, et  
que lesdites particules ont des dimensions pouvant aller de 0,5  
à 5 micromètres environ; et leur utilisation.

FR 2 612 400 - A1

D

La présente invention a pour objet de nouvelles microcapsules utilisables dans le domaine de l'imagerie médicale.

On sait que les microcapsules sont des particules ayant des dimensions allant du micromètre à quelques centaines de micromètres, constituées par une paroi sphérique solide entourant un liquide ou un solide. On distingue les microcapsules des microsphères, qui sont des particules sphériques constituées d'un réseau continu d'un matériau solide dans lequel est dispersée la substance à encapsuler.

Les microcapsules sont utilisées en thérapeutique dans le but de libérer de façon contrôlée des substances actives. Un des intérêts de l'emploi des microcapsules est que le choix de leurs dimensions détermine le lieu d'action privilégié de la substance active qu'elles contiennent. C'est ainsi que des particules de très faibles dimensions (appelées nanoparticules ou millimicrosphères car elles ont des dimensions n'excédant pas quelques centaines de nanomètres) restent dans la circulation générale où elles peuvent libérer progressivement un médicament susceptible d'agir par voie générale. Les particules ayant des dimensions de l'ordre de quelques dizaines de micromètres peuvent être administrées dans un vaisseau irriguant un organe malade et seront temporairement bloquées par les vaisseaux capillaires dudit organe (technique dite de microembolisation), où elles libéreront progressivement, in situ, la substance active. Quant aux microcapsules ayant des dimensions de l'ordre de quelques micromètres, qui ne sont pas bloquées par les capillaires, elles sont généralement retenues brièvement dans les capillaires pulmonaires, puis repassent dans la circulation générale où elles sont captées par les cellules du système réticulo-endothélial et peuvent donc agir dans les organes contenant ces cellules, notamment le foie, la rate et la moelle osseuse, et enfin dans les reins où elles sont finalement éliminées.

On sait par ailleurs que les techniques d'imagerie médicale ont pour but d'explorer les structures anatomiques internes et d'en donner une image, dans le but de distinguer les tissus ou organes sains des tissus ou organes malades. Parmi ces techniques, la scintigraphie et l'imagerie de résonance magnétique nucléaire n'ont reçu jusqu'à présent que des applications limitées, en raison des problèmes techniques que soulève leur utilisation.

On sait que la scintigraphie consiste à réaliser une fixation sélective de molécules radioactives (traceurs) dans un organe particulier, de façon à obtenir, par détection des rayonnements émis, une image de l'organe où s'est effectuée cette fixation. Le rayonnement émis par les traceurs est recueilli par une caméra à scintillations. Un calculateur analogique identifie la brillance de chaque scintillation en fonction de ses coordonnées et

l'impression photographique de chaque point lumineux donne un image de la source émettrice.

Le phénomène de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) résulte de l'interaction d'un champ magnétique extérieur avec les moments magnétiques des noyaux atomiques. Ce phénomène a été étudié notamment sur les noyaux d'hydrogène, et plus particulièrement sur les noyaux d'hydrogène des molécules d'eau. On applique à un échantillon des champs magnétiques de fréquence variable, sous forme d'impulsions, et on observe le système des moments magnétiques pendant son retour à l'état normal, après extinction de la source d'impulsions. Ce phénomène de retour à l'état initial par un temps dit de relaxation, correspondant au temps mis par le système nucléaire pour céder son excédent d'énergie à l'environnement (temps de relaxation  $T_1$ , dit spin-réseau). L'excédent d'énergie d'un noyau peut aussi être cédé à un autre noyau d'énergie inférieure. Ce phénomène est caractérisé par un temps de relaxation dit spin-spin ( $T_2$ ). Ces temps de relaxation sont caractéristiques de la molécule d'eau dans un état physique donné. En particulier, pour la molécule  $H_2O$ , les temps de relaxation des deux hydrogènes dépendent de la mobilité de la molécule : par exemple, pour la molécule d'eau liée à une protéine, les temps de relaxation seront différents de ceux observés pour la molécule d'eau libre. Ces phénomènes peuvent être mis à profit dans l'étude des tissus biologiques, dont on sait qu'ils renferment une forte proportion d'eau, et on a pu mettre en évidence des temps de relaxation différents entre les tissus sains et les tissus pathologiques, en particulier tumoraux. En soumettant des échantillons biologiques à un champ magnétique non uniforme (gradient) on obtient une distribution spatiale des fréquences de résonance, qui est fonction de la distribution spatiale et de l'état physique des molécules d'eau présentes dans l'échantillon. Chaque zone de l'échantillon est caractérisée par des signaux différents ayant une fréquence propre et des temps de relaxation caractéristiques, avec une intensité dépendant de la concentration en eau. Par comparaison et transformation appropriée des signaux obtenus dans plusieurs directions de l'espace délimitent le plan ou le volume de l'échantillon étudié, on peut traduire les signaux de R.M.N. de cet échantillon en images.

On sait par ailleurs que certaines substances chimiques, en particulier les substances paramagnétiques et ferromagnétiques, peuvent influencer les temps de relaxation des noyaux hydrogène de l'eau contenue dans les tissus. Ces substances sont donc susceptibles de jouer le rôle de véritables agents de contraste dans l'imagerie par résonance magnétique (I.R.M.), en accentuant la discrimination entre tissus sains et tissus pathologiques, à condition bien entendu de pouvoir concentrer lesdites

substances de manière suffisamment sélective dans un organe précis.

Le problème principal, dans les deux techniques d'imagerie médicale évoquées ci-dessus, est donc d'obtenir la fixation sélective du marqueur radioactif et/ou paramagnétique.

5           On a déjà décrit l'utilisation de microsphères d'albumine, marquables au technétium radioactif, qui permettent de réaliser des scintigraphies pulmonaires. Toutefois, ces microsphères ont une durée de vie et une stabilité incompatibles avec un marquage durable. De plus, leur diamètre est responsable d'une embolisation dans les capillaires. En outre, le  
10           marquage au technétium doit être effectué après la fabrication des microcapsules, ce qui vient compliquer l'opération de scintigraphie par des manipulations complexes préalables.

          Dans le domaine de l'I.R.M., on a utilisé jusqu'à présent des sels de gadolinium, sous forme de complexes permettant de diminuer la toxicité.  
15           Toutefois, ces complexes sont rapidement stockés et éliminés par les reins, de sorte qu'en pratique, seuls ces organes peuvent être correctement visualisés par I.R.M. à l'aide de tels agents.

          La présente invention a pour objet de nouvelles microcapsules destinées à être utilisées en imagerie médicale (scintigraphie ou I.R.M.) soit  
20           dans un but diagnostique, soit dans un but de recherche, notamment pour l'étude de la biodistribution desdites particules et du marqueur radioactif et/ou paramagnétique qu'elles contiennent. Ces capsules permettent de transporter un agent marqueur paramagnétique et/ou radioactif sous une forme permettant d'atténuer la toxicité, d'augmenter la durée de vie plasmatique, ou  
25           d'améliorer la spécificité vis-à-vis d'organes-cibles particuliers.

          L'invention a plus précisément pour objet des microcapsules utilisables en imagerie médicale, constituées par une paroi en matériau polymérique biodégradable enveloppant une solution aqueuse d'une substance active, caractérisées par le fait que ladite substance active est un agent  
30           complexant ou chélatant, ou un agent paramagnétique et/ou radioactif présent sous la forme d'un complexe ou chélate, et que lesdites particules ont des dimensions pouvant aller de 0,5 à 5 micromètres environ.

          Lorsque les microcapsules de l'invention contiennent un agent complexant ou chélatant, leur mise en oeuvre dans les techniques d'imagerie  
35           médicale comporte une étape préalable de mise en contact des microcapsules avec une solution aqueuse d'un sel de l'agent métallique paramagnétique et/ou radioactif que l'on veut encapsuler, de façon à former le complexe ou chélate désiré.

          Les polymères constituant la paroi sont bien entendu des polymères  
40           biocompatibles. Parmi les polymères biocompatibles et biodégradables, on peut

citer notamment le poly (acide lactique), le poly (acide glycolique), les copolymères d'acides lactique et glycolique, le poly (pipérazine téréphthalamide), et les polycyanoacrylates.

5 L'obtention de microcapsules à base de tels polymères peut être effectuée par exemple selon les techniques de coacervation ou de polymérisation interfaciale, dont le principe est connu en soi.

Les substances paramagnétiques présentes ou à incorporer dans les microcapsules de l'invention sous forme de complexes ou chélates sont par exemple le manganèse, le cuivre, le fer, le cobalt et les terres rares, en  
10 particulier le gadolinium et le dysprosium, ainsi que les isotopes radioactifs de ces éléments. Ces isotopes radioactifs (par exemple Fe 59, Co 57, Gd 153) sont utiles, dans un but de recherche préliminaire, pour étudier notamment la biodistribution chez l'animal par scintigraphie des microcapsules dans chaque cas particulier, tandis que les éléments paramagnétiques non radioactifs  
15 seront utilisés pour obtenir des images de résonance magnétique.

Parmi les substances radioactives, autres que celles mentionnées ci-dessus, présentes dans les microcapsules utilisables en scintigraphie dans un but diagnostique, on citera par exemple les isotopes radioactifs du technétium (Tc 99m), de l'indium (In 111, In 113m), de l'or (Au 198), du  
20 ruthénium (Ru 103), du cobalt (Co 57), du chrome (Cr 51), etc.....

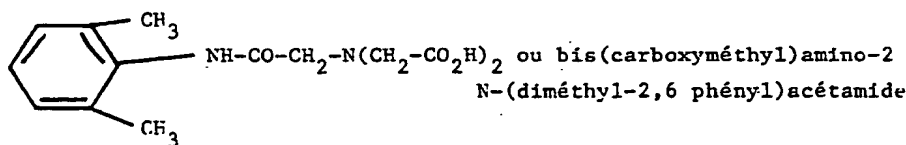
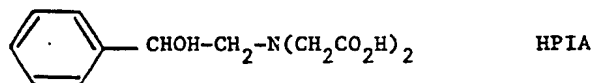
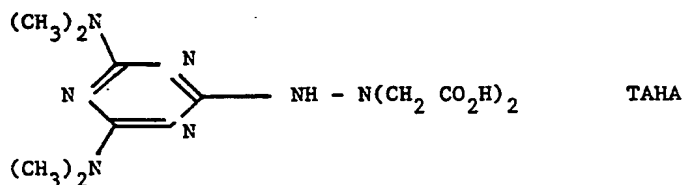
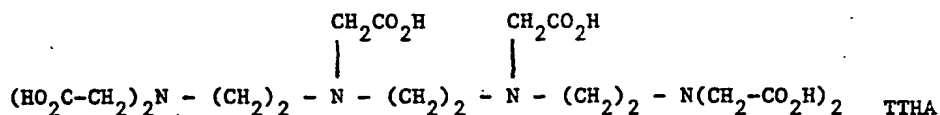
Les quantités d'éléments paramagnétiques et/ou radioactifs dépendent de chaque élément étudié, du système complexant ou chélatant particulier étudié, de l'effet recherché et des possibilités de rétention de chaque type de microcapsule. Ces quantités peuvent être déterminées dans chaque cas par de  
25 simples expériences de routine.

Quant à la quantité d'agent complexant ou chélatant, elle est bien entendu directement proportionnelle à la quantité d'éléments paramagnétiques et/ou radioactifs encapsulée ou à encapsuler.

Les agents complexants ou chélatants présents ou utilisés dans les  
30 microcapsules de l'invention peuvent être toutes molécules organiques compatibles avec une administration parentérale et capables de donner des complexes ou chélates avec les métaux.

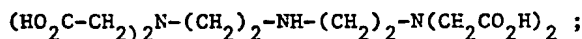
Les agents capables de donner des complexes de coordination avec les métaux sont notamment des molécules dont au moins un atome comporte un doublet  
35 libre (azote des amines tertiaires, oxygène des éthers ou des cétones, etc...). Les agents chélatants sont capables d'échanger avec les métaux des liaisons hydrogène et sont généralement caractérisés par la présence d'au moins deux groupements fonctionnels choisis parmi les groupements acide ou ester carboxylique, amine, cétone ou thiocétone énolisable, phénol, alcool,  
40 thiol, etc...

Parmi les chélatants utilisables dans les microcapsules de la présente invention, on peut citer notamment les composés connus suivants : l'acide éthylènediamine tétracétique (EDTA) ; l'acide diéthylènetriamine pentacétique (DTPA) ; l'acide triéthylène tétramine hexacétique ; les composés de formules suivantes :

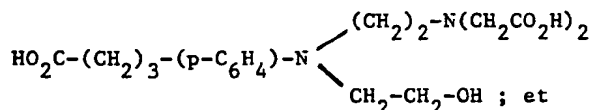


On peut également utiliser les agents complexants suivants, qui sont des composés nouveaux :

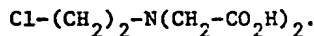
- l'acide diéthylènetriamine tétracétique (DETAT) de formule :



- le composé de formule



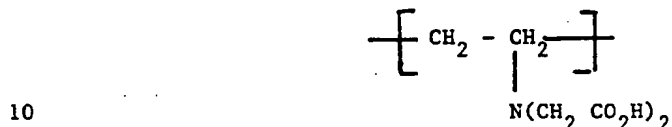
- le bis (carboxyméthyl)amino-1 chloro-2 éthane de formule :



La préparation de ces composés est décrite ci-après dans la partie expérimentale.



Parmi les agents complexants ou chélatants utilisables, on citera également les complexants ou chélatants macromoléculaires, qui présentent l'intérêt d'une moindre diffusion à travers les microcapsules, et d'une moindre toxicité. Parmi les chélatants macromoléculaires connus, on peut  
5 mentionner notamment les produits du type albumine-DTPA, les dérivés de polyvinylamine à base de motifs de formule

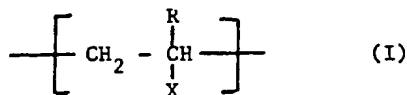


et les dérivés polyméthacryliques, à base de motifs de formule

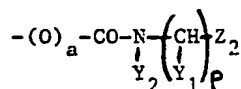


dans laquelle Z représente un groupement  $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$  ou  $-\text{CO}_2 - \text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ . De tels polymères sont décrits dans la littérature.

20 On peut également utiliser les polymères chélatants contenant des motifs de formule I :



dans laquelle R représente  $-\text{H}$  ou  $-\text{CH}_3$ , et X représente un groupement de formule



dans laquelle :

a = 0 ou 1 ;

p est un nombre pouvant varier de 1 à 4,  $\text{Y}_1$  et  $\text{Y}_2$  représentent alors  $-\text{H}$ , et  $\text{Z}_2$  représente alors  $-\text{CO}_2\text{H}$  ;

ou bien p est un nombre égal à 1,  $\text{Y}_2$  représente  $-\text{H}$ ,  $\text{Y}_1$  représente  $-\text{CH}_2\text{SH}$  et  $\text{Z}_2$  représente alors  $-\text{CO}_2\text{H}$  ;

35

ou bien p est un nombre égal à 3 ou 4,  $\text{Y}_1$  et  $\text{Y}_2$  représentent  $-\text{H}$ , et  $\text{Z}_2$  représente le groupement  $-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}_2\text{H}$  ;

ou bien a = 1, p = 0 et  $\text{Y}_2$  et  $\text{Z}_2$  représentent alors un groupement  $-\text{CO}_2\text{H}$  ;

40

ainsi que les esters, les sels et les complexes métalliques formés avec ces polymères.

Ces polymères chélatants, qui peuvent être soit de homopolymères, soit des copolymères, sont des produits nouveaux. Ils peuvent être préparés par exemple par l'action du chlorure d'acryloyle ou de méthacryloyle, ou du chloroformiate de vinyle ou de propènyle, sur la glycine ou autre oméga-aminoacide, la lysine, l'ornithine ou la cystéine, puis polymérisation ou copolymérisation du produit obtenu.

Ils peuvent également être préparés pour les uns par l'action du polyacrylamide ou polyméthacrylamide sur l'acide chloracétique ou analogues, et pour les autres par l'action de la glycine ou autre oméga-aminoacide, sur le polychlorure d'acryloyle ou de méthacryloyle.

Les copolymères sont notamment ceux qui contiennent, à côté des motifs de formule I, d'autres motifs dérivés de monomères à insaturation éthylénique permettant de conférer aux polymères des propriétés de solubilité dans l'eau : il s'agit par exemple des motifs dérivés de la N-vinylpyrrolidone, de la N-méthacryloyl D-glucosamine, de l'acide acrylique ou méthacrylique, de l'acrylamide ou du méthacrylamide, etc...

Ces polymères et leur préparation sont décrits dans la demande de brevet déposée par les mêmes déposants le même jour que la présente demande sous le n° et intitulée "Nouveaux polymères chélatants, leur préparation et leur application".

Comme indiqué ci-dessus, les microcapsules de l'invention sont utilisables dans le domaine de l'imagerie médicale et plus particulièrement en scintigraphie et en I.R.M.

A cet effet, les microcapsules de l'invention sont administrées par voie intraveineuse ou orale, en suspension dans un véhicule approprié (sérum physiologique).

Les quantités injectées dépendent bien entendu du marqueur utilisé, de l'organe exploré et du poids corporel du patient. Ces quantités peuvent être déterminées dans chaque cas par des expériences de routine, par exemple sur un modèle animal.

Dans le cas de la scintigraphie, on administre en général des quantités correspondant à une radioactivité pouvant aller par exemple de 200  $\mu$ Ci à 20 mCi.

Dans le cas de l'I.R.M., on administre des quantités pouvant aller par exemple de 0,1 à 0,5 mmole de métal marqueur par kilo de poids corporel.

On va maintenant décrire plus particulièrement, à titre d'illustration, un mode de réalisation de microcapsules à base de polycyanoacrylate d'alkyle et en particulier les polycyanoacrylates d'alkyle

dont le groupement alkyle comporte de 2 à 6 atomes de carbone.

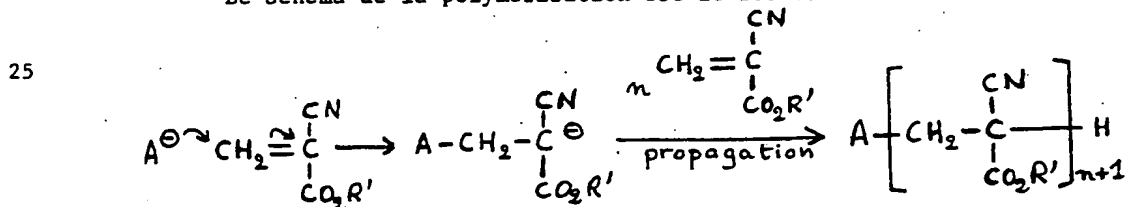
On sait que ces polycyanoacrylates sont utilisés depuis longtemps comme tissu adhésif biodégradable en chirurgie, et leur absence de toxicité a été démontrée par de nombreuses études.

5 Le principe de la préparation de microcapsules à base de cyanoacrylate par polymérisation interfaciale est également connu et a été décrit par exemple par D.A. WOODS et al, International Journal of  
10 Pharmaceutics, 8, 35-43 (1981). Ces auteurs ont préparé de telles microcapsules dans le but d'encapsuler des protéines et en particulier des enzymes. Ils ont obtenu des microcapsules ayant des dimensions allant de 30 à 400 micromètres. De telles capsules sont inutilisables pour l'administration dans la circulation sanguine puisqu'elles provoqueraient inévitablement des embolisations par blocage capillaire.

15 On a maintenant découvert qu'il est possible d'obtenir, par le choix de conditions opératoires particulières, des microcapsules de polycyanoacrylate d'alkyle ayant des dimensions pouvant aller de 0,5 à 5 micromètres, avec une faible variation dans la distribution des tailles de particules, ce qui permet l'administration de ces microcapsules dans la circulation sanguine, sans risque de blocage capillaire.

20 Les cyanoacrylates d'alkyle polymérisent par un processus de polymérisation anionique, c'est-à-dire que l'initiateur de la réaction est un anion ou plus généralement un réactif nucléophile.

Le schéma de la polymérisation est le suivant :



30 Dans le schéma précédent,  $A^{\ominus}$  représente le réactif initiateur nucléophile, et  $R'$  représente un groupement alkyle ayant 2 à 6 atomes de carbone.

35 Comme on le voit sur le schéma ci-dessus, l'initiateur nucléophile se trouve chimiquement incorporé au polymère, et ce phénomène peut être mis à profit dans la réalisation des microcapsules, comme cela sera indiqué ci-après.

Pour réaliser des microcapsules de polycyanoacrylate, on opère selon la méthode connue de polymérisation interfaciale qui consiste à préparer, avec une solution aqueuse basique et une phase organique, une émulsion du type  
40 eau-dans-l'huile dont les gouttelettes dispersées ont les dimensions requises,

puis à ajouter le monomère en solution dans la phase organique. Les conditions basiques favorisent la polymérisation, et dans ces conditions le monomère va polymériser à l'interface des microgouttelettes d'eau et de la phase organique, cette polymérisation conduisant à la construction de la paroi des microcapsules dans lesquelles les microgouttelettes d'eau vont être emprisonnées.

Pour préparer les microcapsules de polycyanoacrylate utilisables selon l'invention, on opère selon un procédé caractérisé par le fait :

- que l'on prépare une solution aqueuse d'un chélatant ou complexant, ou d'un complexe ou chélate d'un marqueur radioactif et/ou paramagnétique ;
- que l'on prépare une solution d'un tensio-actif dans un solvant organique non miscible à l'eau, ledit tensio-actif étant apte à favoriser la réalisation d'émulsions du type eau-dans-l'huile ;
- que l'on verse la solution aqueuse dans la solution organique ;
- que l'on réalise une émulsion eau-dans-l'huile avec un système d'agitation ayant une vitesse suffisante pour obtenir des microgouttelettes ayant les dimensions désirées ;
- que l'on ajoute dans ladite émulsion une solution du monomère dans un solvant organique non-miscible à l'eau et miscible dans la phase organique de l'émulsion ;
- que l'on poursuit, si désiré, l'agitation pendant un temps n'excédant pas 3 minutes ;
- que, si désiré, on dilue la phase organique par addition d'un solvant organique compatible, de façon à arrêter la polymérisation ;
- et que l'on laisse sédimenter puis lave les microcapsules et les conserve dans un milieu liquide approprié.

Dans des modes de réalisation particuliers, ce procédé peut encore présenter les caractéristiques suivantes, prises isolément ou en combinaison :

- le solvant est un mélange de cyclohexane et de chloroforme en proportions pouvant aller par exemple de 2:1 à 6:1 ;
- la phase aqueuse a un pH de 9 à 12, ce pH pouvant être obtenu par exemple par addition d'une quantité convenable de carbonate de sodium ;
- la phase aqueuse représente de 5 à 30% et de préférence de 5 à 20%, en volume, de la phase organique initiale ;
- le tensio-actif présent dans la phase organique initiale est un tensio-actif de type lipophile tel que par exemple le Span 85 (Trioléate de Sorbitant commercialisé par Fluka) ; on ajoute par exemple de 2 à 8% et de préférence de 3 à 7% (poids/volume) de tensio-actif dans la phase organique initiale ; on a constaté que les dimensions des particules et la distribution des tailles passent par un minimum lorsqu'on accroît la concentration en

tensio-actif ; par exemple dans le cas du Span 85, les microcapsules de taille minimum sont obtenues avec une concentration de 4% ;

- on réalise l'agitation avec un appareil homogénéiseur ayant une vitesse de rotation allant par exemple de 15.000 à 45.000 tours/minute ; plus la vitesse augmente, plus le diamètre des particules diminue et plus la distribution de taille est étroite;

- on lave les particules dans une solution aqueuse d'éthanol contenant un détergent de type hydrophile, de façon à disperser dans l'eau la phase organique résiduelle ; les derniers lavages sont effectués à l'aide de sérum physiologique.

Les microcapsules peuvent être conservées, au froid, dans le sérum physiologique.

Bien entendu, toutes les manipulations lors de la préparation doivent être faites dans des conditions rigoureuses d'aseptie.

Dans un mode de réalisation particulier, on incorpore à la phase aqueuse de départ une protéine qui est capable de jouer le rôle de réactif nucléophile, d'initier la polymérisation des cyanoacrylates, et de se trouver ainsi incorporée à la paroi des microcapsules. L'incorporation d'une protéine à la paroi des microcapsules présente plusieurs avantages :

- elle renforce la solidité de la paroi et réduit la vitesse de diffusion du marqueur à l'extérieur de la capsule ;

- elle permet un marquage secondaire des capsules par marquage de la protéine avec par exemple l'iode ou le technétium radioactifs selon les techniques usuelles ;

- en outre, elle est susceptible de favoriser dans certains cas, le transport des microcapsules vers un organe-cible privilégié.

Parmi les protéines qu'il est possible d'incorporer dans les microcapsules, on citera en particulier la gélatine, la sérumalbumine bovine ou humaine, l'hémoglobine, le fibrinogène, les gammaglobulines, y compris des anticorps monoclonaux, etc...

La concentration en protéine dans la phase aqueuse encapsulée est par exemple de  $10^{-9}$  à  $10^{-2}$  mole/litre.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

EXEMPLE 1 : Complexe DTPA-gadolinium dans des microcapsules de polycyanoacrylate d'isobutyle contenant de l'albumine.

On prépare d'une part une solution de 4% de Span 85 dans 40ml d'un mélange cyclohexane-chloroforme 4:1, et d'autre part une solution aqueuse contenant du carbonate de sodium 0,2M contenant 0,5% (poids/volume) de

sérumalbumine bovine et 0,2M d'un complexe DTPA-gadolinium.

On verse 4ml de cette solution aqueuse dans la solution organique de détergent et on effectue l'émulsion avec un homogénéiseur de type Virtis 45 (VIRTIS CY, New York) tournant à une vitesse de 25.000 tours/minute.

5 On ajoute lentement une solution de 0,49g de cyanoacrylate d'isobutyle dans 20cm<sup>3</sup> d'un mélange cyclohexane-chloroforme (4:1) en maintenant l'agitation constante pendant 3 minutes.

On ajoute alors du cyclohexane pour obtenir un volume total de 100ml.

10 Après décantation des microcapsules on élimine le maximum de solvant par aspiration puis on ajoute 20ml d'une solution aqueuse de Tween 20 (monolaurate de sorbitan polyoxyéthyléné - Merck) à 30%. Après 5 minutes sous agitation modérée, on ajoute 40ml d'eau et 20ml d'éthanol. On sépare les microcapsules par centrifugation (à une vitesse de 1000-4000 tours/minute) à 15 0°C. Les microcapsules sont ensuite lavées 3 fois par une solution de sérum physiologique puis stockées dans le minimum de sérum physiologique stérilisé.

Le diamètre moyen en nombre des microcapsules, mesuré par granulométrie par effet Coulter, est d'environ 2,5µm.

De façon analogue, on a préparé les microcapsules suivantes :

20 - polycyanoacrylate d'isobutyle + gélatine : pour cela on remplace la solution de sérumalbumine par 40ml d'une solution aqueuse contenant 5g de gélatine. Dans ce cas, il est avantageux d'ajouter 5ml de formol à 37% après l'addition du cyclohexane, et de laisser ensuite reposer pendant 12 heures à 4°C afin de favoriser le durcissement de la gélatine.

25 On a également préparé de façon analogue des microcapsules présentant les caractéristiques suivantes :

- complexe DTPA-gadolinium dans des microcapsules de polycyanoacrylate d'isobutyle ;

30 - complexe polymère chélatant-gadolinium dans des microcapsules de polycyanoacrylate d'isobutyle contenant du fibrinogène marqué à l'iode 125 ;

- complexe DTPA-Indium dans des microcapsules de polycyanoacrylate d'isobutyle contenant 0,5% de sérumalbumine bovine ou humaine ;

35 - complexe albumine-DTPA-In 111 (préparé selon la méthode de HNATOWICH et al., Science, 1983, vol.220, pp.613-615) dans des microcapsules de polycyanoacrylate d'isobutyle contenant 0,5% de sérumalbumine bovine ou humaine ;

- complexe DTPA-Indium dans des microcapsules de polycyanoacrylate d'isobutyle contenant 5% de sérumalbumine bovine ou humaine marquée à l'iode 125.

40

On a également préparé des microcapsules de polycyanoacrylate d'isobutyle-albumine marquées au technétium 99m. Ce marquage est effectué après fabrication et lavage des microcapsules, dans une solution contenant des microcapsules et du pertechnétate de sodium, en présence de chlorure stanneux, sous atmosphère d'azote, selon une méthode connue en soi. Cette technique permet le marquage par Tc 99m des microcapsules au niveau de l'albumine qu'elles contiennent.

Etude de la biodistribution des microcapsules chez le rat.

Cette étude a été effectuée à l'aide de divers types de microcapsules :

- polycyanoacrylate d'isobutyle + 5% (poids/volume) d'albumine marquée à l'iode 125 ;
- polycyanoacrylate d'isobutyle + 5% d'albumine marquée au technétium 99m ;
- polycyanoacrylate d'isobutyle + 0,5% d'albumine marquée au Tc 99m ;
- polycyanoacrylate d'isobutyle + 5% d'albumine, marquée avec le complexe Albumine-DTPA-Indium 111.

Les microcapsules, en suspension dans le sérum physiologique, ont été administrées à des rats, à raison de 1ml par kg de poids corporel, le rapport volumique capsules/(volume total) étant environ 1/4. Les quantités administrées correspondent selon les cas à des valeurs de 10µCi à 2mCi par rat.

La proportion de captation de la radioactivité par les divers organes a été évaluée par deux méthodes : d'une part par dissection, pesage des organes et comptage de la radioactivité, et d'autre part par scintigraphie dans les zones d'intérêt (cas du Tc 99m).

Les résultats obtenus avec les différents types de microcapsules étudiés sont comparables et sont résumés dans le Tableau suivant :

Temps après injection (minutes)	% de captation de la radioactivité par				
	poumon	foie	rate	rein	sang
10	7	60	2	2	29
30	6	67	4	1	22
40	5	69	4	1	21

Préparation de l'acide diéthylènetriamine tétracétique

On dissout 0,8g d'acide iminodiacétique dans 60ml d'éthanol contenant 36ml de soude 0,5N. On ajoute ensuite 0,54g de chlorhydrate de bis(chloro-2 éthyl) amine. On porte et maintient au reflux pendant 6 heures.

5 On isole le produit obtenu par évaporation et séchage.

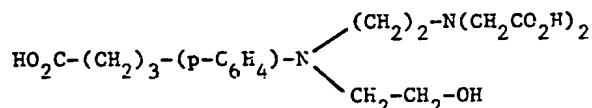
La structure du produit est confirmée par le spectre de R.M.N.  $^1\text{H}$ . On a préparé un complexe de ce composé chélatant avec le technétium 99m, par réduction ménagée du pertechnétate de sodium, sous atmosphère d'azote, par le chlorure stanneux, en présence dudit chélatant.

10 On a vérifié par chromatographie que la majorité de la radioactivité introduite se retrouve après formation du complexe, sur la structure chélatante.

On a également préparé un complexe ferrique de l'acide diéthylène triamine tétracétique (DETAT). Pour cela, on prépare une solution 0,1M de  $\text{FeCl}_3$  dans l'éthanol. A 50ml de cette solution, on ajoute 50ml d'une solution aqueuse 0,1M de DETAT. On règle le pH à 7 par addition d'une solution d'ammoniaque diluée. On laisse au bain-marie pendant 3 heures puis refroidit. Le complexe ferrique précipité est recueilli par filtration, lavé à l'éthanol et séché sous pression réduite.

20

Préparation d'un composé chélatant de formule



25

De façon analogue à celle décrite à l'exemple précédent, on fait agir l'acide iminodiacétique sur l'acide p-[bis(chloro-2 éthyl)amino]phényl-4 butyrique (chlorambucil) en présence de soude, dans l'éthanol. En fin de réaction, le produit ayant la formule indiquée ci-dessus précipite par acidification (pH 3,5) du milieu réactionnel.

30

Le spectre R.M.N.  $^1\text{H}$  confirme la structure du produit.

On a préparé à l'aide de ce composé chélatant un complexe avec le Tc 99m et avec le fer (III).

35

On a vérifié que les complexes formés étaient stables.

Préparation du bis(carboxyméthyl)amino-1 chloro-2 éthane

Ce produit est obtenu par réaction, pendant 2 heures au reflux, de 2 moles d'acide chloracétique sur 1 mole de chlorhydrate de chloroéthylamine, dans l'éthanol contenant 6 moles de soude.

40

On a préparé des complexes de ce composé avec le fer (III).



# REVENDEICATIONS

1. Microcapsules utilisables en imagerie médicale, constituées par une paroi en matériau polymérique biodégradable enveloppant une solution aqueuse d'une substance active, caractérisées par le fait que ladite substance active est un agent complexant ou chélatant ou un agent paramagnétique et/ou radioactif présent sous la forme d'un complexe ou chélate, et que lesdites particules ont des dimensions pouvant aller de 0,5 à 5 micromètres environ.

2. Microcapsules selon la revendication 1, caractérisée par le fait que ledit matériau polymérique est choisi parmi le poly (acide lactique), le poly (acide glycolique), les copolymères d'acides lactique et glycolique, le poly (pipérazine téréphthalamide), le polyméthacrylate de méthyle, et les polycyanoacrylates.

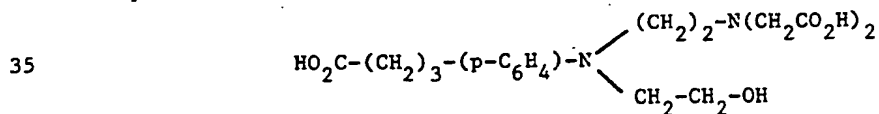
3. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que ladite substance paramagnétique présente sous forme de complexes ou chélates est choisie parmi le manganèse, le cuivre, le fer, le cobalt et les terres rares, en particulier le gadolinium et le dysprosium, ainsi que les isotopes radioactifs de ces éléments.

4. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisées par le fait que ladite substance radioactive est choisie parmi les isotopes radioactifs du technétium (Tc 99m), de l'indium (In 111, In 113m), de l'or (Au 198), du ruthénium (Ru 103), du cobalt (Co 57), du chrome (Cr 51), gadolinium (Gd 153), etc.....

5. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que ledit chélate est obtenu avec un agent chélatant contenant au moins deux groupements acide ou ester carboxylique, amine, cétone ou thiocétone énolisable, phénol, alcool, thiol, etc...

6. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que ledit agent chélatant est l'acide diéthylène triamine tétracétique, ou le bis(carboxyméthyl)amino-1 chloro-2 éthane.

7. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que ledit agent chélatant est un composé de formule :



8. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées par le fait que ledit complexe ou chélate est formé avec un agent complexant ou chélatant macromoléculaire.

9. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que le matériau polymérique de leur paroi est un polycyanoacrylate d'alkyle.

5 10. Microcapsules selon la revendication 9, caractérisées par le fait que leur paroi contient, outre ledit matériau polymérique, au moins une protéine.

10 11. Microcapsules selon la revendication 10, caractérisées par le fait que ladite protéine est choisie parmi la gélatine, la sérumalbumine bovine ou humaine, l'hémoglobine, le fibrinogène, les gammaglobulines, les anticorps monoclonaux, etc...

12. Microcapsules selon l'une quelconque des revendications 10 et 11, caractérisées par le fait que la proportion de protéine dans la phase aqueuse encapsulée est de  $10^{-9}$  à  $10^{-2}$  mole/litre.

15 13. Procédé de préparation de microcapsules telles que définies dans l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'on prépare lesdites capsules selon les techniques connues de coacervation ou de polymérisation interfaciale.

14. Procédé de préparation des microcapsules telles que définies dans l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisé par le fait :

20 - que l'on prépare une solution aqueuse d'un d'un chélatant ou complexant ou d'un complexe ou chélate d'un marqueur radionactif et/ou paramagnétique ;

25 - que l'on prépare une solution d'un tensio-actif dans un solvant organique non miscible à l'eau, ledit tensio-actif étant apte à favoriser la réalisation d'émulsions du type eau-dans-l'huile ;

- que l'on verse la solution aqueuse dans la solution organique ;  
- que l'on réalise une émulsion eau-dans-l'huile avec un système d'agitation ayant une vitesse suffisante pour obtenir des microgouttelettes ayant les dimensions désirées ;

30 - que l'on ajoute dans ladite émulsion une solution du monomère dans un solvant organique non-miscible à l'eau et miscible dans la phase organique de l'émulsion ;

- que l'on poursuit, si désiré, l'agitation pendant un temps n'excédant pas 3 minutes ;

35 - que, si désiré, on dilue la phase organique par addition d'un solvant organique compatible, de façon à arrêter la polymérisation ;

- et que l'on laisse sédimenter puis lave et isole lesdites microcapsules et les conserve dans un milieu liquide approprié.

40 15. Utilisation des microcapsules telles que définies dans l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans le domaine de l'imagerie médicale par scintigraphie ou par résonance magnétique.